

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：34413

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460218

研究課題名(和文) 脂肪酸結合アルブミンによるHIF-1活性化の分子機構とその制御による腎保護効果

研究課題名(英文) Molecular mechanisms underlying HIF-1 activation by fatty acid-bearing albumin and renal protective effect by its regulation

研究代表者

永井 純也 (NAGAI, Junya)

大阪薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：20301301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アルブミン曝露によるHIF-1活性化に関与する脂肪酸の同定とHIF-1活性化におけるPPARの関与について解析した。

HK-2細胞へのパルミチン酸やオレイン酸処理はHIF-1活性化に伴い上昇するGLUT輸送活性を増加させなかったが、アラキドン酸処理は上昇させた。次に、PPARアゴニストピオグリタゾン処理によりHIF-1、GLUT1及びBCRPの各mRNA発現誘導を認めた。また、ピオグリタゾン処理によりGLUT及びBCRPの輸送活性は上昇した。以上、PPAR活性化はHIF-1誘導を惹き起こし、その結果としてGLUT1やBCRPの機能を上昇させる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed analysis to identify fatty acid which plays an important role in HIF-1 activation by fatty acid-bearing albumin exposure and to examine an involvement of PPAR gamma in fatty acid-bearing albumin-induced HIF-1 activation in HK-2 cells.

Treatment with palmitic acid and oleic acid had no significant effect on GLUT-mediated transport activity, which is enhanced by HIF-1 activation, while the activity of GLUT was increased by treatment with arachidonic acid. These results indicated that arachidonic acid is involved in albumin-induced HIF-1 activation. We also observed induction of HIF-1 alpha, GLUT1 and BCRP mRNA expression by treatment with a PPAR gamma agonist pioglitazone. In addition, pioglitazone increased transport activity of GLUT and BCRP in a concentration-dependent manner. These findings suggested that PPAR gamma induced HIF-1 activation, resulting in enhanced transporter activity of GLUT and BCRP, HIF-1 target gene products.

研究分野：薬物動態学

キーワード：脂肪酸 アルブミン 尿細管上皮細胞 HIF-1 GLUT1 BCRP

1. 研究開始当初の背景

近年、慢性腎臓病 (CKD) はその患者数が我が国だけでも 1300 万人を超えると推定されている。CKD を発症する患者には腎臓自体の疾患のみならず、糖尿病や高血圧などの生活習慣病、膠原病や薬物投与などによっても惹き起こされるため、今後その患者数はさらに増加するものと考えられる。

健常人の場合、腎糸球体のバリア機能によって血漿中タンパク質の糸球体ろ過は著しく制限されている。しかし、タンパク尿を呈する CKD 患者では糸球体バリア機能の低下によって、アルブミンなどの血漿中タンパク質が尿細管腔中へと漏出し、タンパク質が尿中に大量に認められるようになる。また、その尿細管腔中へのタンパク質の漏出が、腎尿細管細胞障害や腎線維化を惹き起こすことが知られており、タンパク尿自体が人工透析や腎移植を必要とする腎不全への進行因子であることが強く示唆されている。

我々は本研究開始前までに、尿細管上皮細胞における血漿タンパク質 (アルブミン、IgG) や薬物 (アミノグリコシド系抗生物質) のエンドサイトーシス介在性輸送およびその輸送制御による細胞障害防御法に関する研究を進めてきた。そして最近、我々はアルブミンを負荷した尿細管上皮細胞において、転写因子 HIF-1 の発現が顕著に誘導されることを見出した。さらに HIF-1 標的遺伝子である GLUT1 mRNA 発現が上昇することも認めた。

一方、タンパク尿に伴う腎障害の進展には、尿中のアルブミン分子自体よりも、アルブミンに結合している脂肪酸が尿細管細胞障害に重要であることが示唆されていた。そこで、我々はアルブミン処理に伴う HIF-1 発現上昇にアルブミンに結合している脂肪酸の役割について検討した。その結果、通常血漿中に存在するアルブミン (脂肪酸結合型) 負荷では HIF-1 発現誘導が認められるものの、脂肪酸を除去したアルブミン (脂肪酸除去型) の場合には HIF-1 発現誘導がほとんど起こらないことを新たに見出した。さらに、この HIF-1 発現と対応して、脂肪酸結合型アルブミン処理で認められる HIF-1 標的遺伝子 GLUT1 mRNA の発現誘導が、脂肪酸除去型アルブミンではほとんど見られないことも認めた。

上述したように、我々は HIF-1 がアルブミン負荷によって発現が上昇すること、そして HIF-1 の発現上昇にはアルブミン自体よりもアルブミンに結合している脂肪酸が重要な役割を果たしていることを見出した。これまでに脂肪酸が HIF-1 発現を変化させることを示した報告は知る限りなく、その分子機構は不明である。また、HIF-1 は GLUT1 に加え、結合組織増殖因子 CTGF や血小板由来成長因子 PDGF などの組織線維化に関与する遺伝子の発現を上昇させることが示さ

れており、尿細管に漏出したアルブミンによる HIF-1 の活性化が腎線維化への進行に関与している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、まずアルブミン負荷による HIF-1 活性化の分子機構について、特に HIF-1 活性化における脂肪酸の役割とその標的遺伝子の発現誘導に焦点をあてて解析を行った。加えて、脂肪酸をリガンドとする PPAR が脂肪酸結合型アルブミン誘発 HIF-1 活性化において果たす役割について明確にするため、PPAR アゴニスト処理による影響を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 使用機器・器具

培養器具として、100 mm culture dish、35 mm culture dish、24-well plate (IWAKI) を用いた。

実験に使用した機器・器具として、リアルタイム PCR 装置: TP700 (TaKaRa)、電源装置: AE-8130、電気泳動槽: AE-6500 ラピダス・ミニスラブ 電気泳動槽 (ATTO)、タンク式プロットング装置: Mini Trans-Blot[®] cell (BIO-RAD)、luminescent image analyzer: LAS-3000 (FUJIFILM)、卓上遠心機: 3520 (KUBOTA)、マイクロプレートリーダー: EnSpire[™] Multimode Reader 2300 (PerkinElmer)、紫外線可視分光光度計: UV-160A UV-VISIBLE RECORDING SPECTRO PHOTO METER (SHIMADZU)、位相差顕微鏡: 培養顕微鏡 CKX53 (OLYMPUS) を用いた。

(2) 細胞培養

HK-2 細胞は、10% FBS を含む DMEM/F-12 培地あるいは DMEM、F-12 の 1:1 混合培地を用い、CO₂ インキュベーター内 (37°C、5% CO₂-95% air) で 90% 程度コンフルエントになるまで 6-7 日間培養した。細胞の継代は 0.05% Trypsin-0.53 mM EDTA を用いて細胞を剥離し 100 mm culture dish (維持用) に 80~100 x 10⁴ cells/dish となるように播種した。24-well plate (実験用) には 5~10 x 10⁴ cells/well となるように播種した。培地交換は 2 日毎に行い、実験あるいは継代前日にも行った。実験には 5-7 日間培養した細胞 (passage #37-54) を用いた。

(3) 薬物処理

脂肪酸結合型ヒト血清アルブミン [FA(+)-HSA]、脂肪酸除去型ヒト血清アルブミン [FA(-)-HSA]、CoCl₂、pioglitazone は無血清培地中に溶解した後、その培地を用いて培地交換を行い、あらかじめ設定した時間で細胞を処理した。

(4) 細胞内移行特性解析

[³H]標識体の細胞内取り込み解析

実験には phosphate-buffered saline (PBS)あるいはNaClをcholine chlorideに置換したNa⁺-free PBSを用いた。24-wellプレートに細胞を培養し、その培地を除去後、細胞をPBS 1 mLで2回洗浄し、37°Cまたは4°CのPBSあるいはNa⁺-free PBSで10-20分間プレインキュベーションした。その後、プレインキュベーション溶液を除いてD-[³H]glucoseあるいは[³H]palmitic acidを含む溶液を0.3 mL添加し、一定時間インキュベーションした。基質溶液を除去した後に氷冷したPBS 1 mLで2回洗浄した。0.1 M NaOH (0.2 mL)を加えて細胞を溶解し、遠心(10,000 rpm x 5 min)後、その細胞溶解液にLiquiscint (National Diagnostics)を3 mL加え、液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定した。また、細胞溶解液20 µLを用いてBradford法にてタンパク量を測定した。

蛍光物質の細胞内取り込み解析

実験の基礎となる緩衝液にはPBSを用いた。24-wellプレートに細胞を培養し、その培地を除去後、細胞をPBS 1 mLで2回洗浄し、37°Cまたは4°CのPBSあるいはNa⁺-free PBSで10-20分間プレインキュベーションした。その後、プレインキュベーション溶液を除いて蛍光物質Hoechst33342 (ABCトランスポーターBCRP基質)を含む溶液を0.3 mL添加し、一定時間インキュベーションした。基質溶液を除去した後に氷冷したPBS 1 mLで2回洗浄した。0.1% Triton X-100を含むPBS(0.25 mL)を加えて細胞を溶解し、遠心(10,000 rpm x 5 min)後、その細胞溶解液100 µLにおける蛍光強度をマイクロプレートリーダーを用いて測定した。また、細胞溶解液10 µLを用いてBradford法にてタンパク量を測定した。

(5) RT-PCR 法

RNAの抽出

細胞から培地を除去した後、PBSで2回洗浄し、RNeasy[®] Mini Kit(QIAGEN)を用いて取扱説明書に記載されたプロトコールに従いtotal RNAを抽出した。抽出したRNA濃度は260 nmにおける吸光度を測定することで算出した。

Realtime-PCR

RNAの抽出、逆転写反応はRT-PCR法の時と同様に行った。

PCR反応は、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO)を用い、取扱説明書に記載されたプロトコールに従って行った。PCR反応の後、融解曲線分析を行い、非特異的産物が生成されていないことを確認した。各装置でのPCR反応条件は、前熱変性95°C 30秒、その後、95°C 10秒(熱変性) 60°C 15秒(プライマーのアニーリング) 72°C 15

秒(伸長反応)を40サイクルとした。

(6) タンパク質の発現解析

Cell lysate の調製

HK-2細胞を培養し、薬物処理などを行った後、PBSを加えてセルスクレーパーで細胞をかきとり、4°C、3,000 rpmで5分間遠心した。その後、上清を除去し、氷冷Preparation buffer (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton-X, 0.1% SDS, 1% sodium deoxycholate, 1% protease inhibitor cocktail, pH7.4)を加え懸濁した。ボルテックスをかけて30分間氷上で放置した後、4°C、10,000 rpmで3分間遠心後、その上清をcell lysateとした。Cell lysate中のタンパク量はbovine serum albumin (BSA)を標準物質として用い、Lowry法により定量した。

SDS-PAGE

Cell lysateを1×SDS sample bufferに混合した泳動サンプルを用いた。電気泳動はSDS-PAGEにより、濃縮ゲル(4% polyacrylamide, 0.1% SDS)および分離ゲル(8% polyacrylamide, 0.1% SDS)を用い、室温にて、定電流(20 mA/ゲル1枚)で泳動した。

Western blotting

SDS-PAGE後のゲルはpolyvinylidene difluoride (PVDF膜)と重ね、100 Vの定電圧60分間通電を行い、膜に転写した。転写終了後のPVDF膜を5%スキムミルク含有TBS-Tに浸し、ブロッキングした。PVDF膜をTris-buffered saline (TBS)で洗浄した後、希釈した一次抗体と1~2時間インキュベーションした。反応後の膜をTBSで洗浄し、希釈した二次抗体と1~2時間インキュベーションした。反応終了後、膜をTBSで洗浄し、ECL BLOTTING REAGENTS (GE Healthcare)を用いて発光させ、ImageQuant LAS 3000により抗原タンパク質を検出した。

4. 研究成果

(1) アルブミン負荷に伴うHIF-1活性化を導く脂肪酸の同定解析

本研究を開始した段階において、アルブミン曝露によるHIF-1活性化は、アルブミン自体よりもむしろアルブミンに結合している脂肪酸が重要な役割を果たしている可能性が示唆されていた。一方、血清アルブミンは血漿中において様々な脂肪酸を結合した状態で存在することが知られている。我々は以前に、ヒト血漿アルブミンに結合している脂肪酸の組成を解析したところ、含量の多い脂肪酸として、palmitic acid、stearic acid、oleic acid、linoleic acid、arachidonic acid

の5種類が挙げられた。

そこで、本研究ではまず、HIF-1 活性化を惹き起こす脂肪酸を同定することを目的として、脂肪酸除去したアルブミンに種々の脂肪酸を混合して処理した HK-2 細胞における GLUT 輸送活性の変動について検討した。

HK-2 細胞を播種した数日後に、無血清培地で 24 時間培養し、その後、HIF-1 誘導剤 CoCl_2 や種々の脂肪酸を結合させたアルブミンで 48 時間処理することで実施した。取り込み実験の基質として、D- ^3H glucose を用い、阻害剤として促進拡散型グルコーストランスポーター GLUT 阻害剤である phloretin を用いた。

まず、HK-2 細胞における HIF-1 の活性化を GLUT 介在性の D- ^3H glucose 取り込み活性を指標に評価できるかどうかについて確認を行った。すなわち、HIF-1 誘導剤 CoCl_2 で細胞を処理した後、GLUT 阻害剤 phloretin 非存在下と存在下で D- ^3H glucose 取り込み活性を測定した。その結果、 CoCl_2 で HK-2 細胞を処理することにより GLUT の輸送活性が上昇することを確認した。

次に、D- ^3H glucose の取り込みに及ぼす脂肪酸結合形アルブミン FA(+)HSA および脂肪酸除去形アルブミン FA(-)HSA 処理の影響について検討した。既に報告した結果から予想されたように、FA(+)HSA 処理群のみで GLUT 輸送活性が上昇することが確認された。

上記の実験から GLUT 輸送活性を指標として、HIF-1 の活性化が評価できることが示されたことから、次に HIF-1 活性化を惹き起こす脂肪酸の同定について検討を進めた。実験に用いた脂肪酸は先にアルブミンに結合している脂肪酸組成の解析結果から含量の多い脂肪酸を選択した。まず、D- ^3H glucose の取り込みに及ぼす palmitic acid 含有 FA(-)HSA 処理の影響について検討した。その結果、10 ~ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で palmitic acid を含有させたアルブミン処理では、GLUT 輸送活性に有意な影響を示さなかった。

次に、D- ^3H glucose の取り込みに及ぼすオレイン酸 含有 FA(-)HSA 処理の影響について検討した。その結果、オレイン酸処理の場合においても、10 ~ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度では GLUT 輸送活性に有意な変化は認められなかった。

続いて、D- ^3H glucose の取り込みに及ぼす arachidonic acid 含有 FA(-)HSA 処理の影響について検討した。その結果、10 ~ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ arachidonic acid 処理では有意な輸送活性の変動は見られなかったが、100 ~ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ においては処理濃度依存的に GLUT 輸送活性が上昇することが認められた。

これらの結果から、アルブミン曝露によって認められる HIF-1 活性化には、アルブミンに結合している脂肪酸の中でも、arachidonic acid が重要な役割を果たしていることが示唆された。Arachidonic acid は PPAR のアゴニストであることから、

arachidonic acid が PPAR を活性化し、それに続いて HIF-1 の活性化が引き起こされた可能性が示唆された。しかし、この詳細な分子メカニズムについてはさらなる解析が必要であると考え、今後その他の脂肪酸による影響についても検討を進めていく必要がある。

(2) HIF-1 標的遺伝子産物の発現・機能に及ぼす PPAR アゴニストの影響

HIF-1 の活性化が PPAR の活性化を引き起こすかどうかを検討するため、HK-2 細胞を HIF-1 誘導剤 CoCl_2 処理し、HIF-1 標的遺伝子の発現変化と PPAR mRNA の発現変化について比較した。その結果、300 μM CoCl_2 処理によって、PDGF-B、GLUT1 および BCRP mRNA などの HIF-1 標的遺伝子の発現上昇が観察されたが、PPAR mRNA の発現誘導は認められず、HIF-1 活性化は PPAR の活性化を引き起こさないものと考えられた。

先に示した結果より、HIF-1 活性化が PPAR の活性化を導く可能性は低いことが示された。そこで、次に PPAR の活性化が HIF-1 の活性化を起こすか否かについて検討を進めた。

そこで、PPAR 誘導剤である pioglitazone で処理した HK-2 細胞を用いて実験を行った。まず、pioglitazone 処理が PPAR の活性化を起こすかどうかについて確認するため、PPAR mRNA 発現変化について検討した。その結果、pioglitazone 処理濃度依存的な PPAR mRNA の発現誘導が認められ、pioglitazone 処理により PPAR の活性化が起こることが確認された。

次に、pioglitazone 処理により HIF-1 活性化が認められるかどうかについて検討した。まず、HIF-1 mRNA 発現に及ぼす pioglitazone の影響について検討した結果、HIF-1 mRNA は pioglitazone 処理濃度依存的に上昇することが認められた。さらに、pioglitazone 処理は HIF-1 のタンパクレベルでも発現を上昇させることが示された。

次に、HIF-1 の標的遺伝子である GLUT1 mRNA の発現について調べたところ、pioglitazone 処理によって GLUT1 mRNA の発現が誘導されることが認められた。これらの結果より、pioglitazone は HIF-1 を mRNA レベルとタンパクレベルの両方を上昇させることが示された。

続いて、GLUT1 の機能面での変動について評価するため、GLUT1 介在性輸送活性に及ぼす pioglitazone 処理の影響について検討した。すなわち、各種濃度の PPAR アゴニスト処理を行った細胞における D- ^3H glucose の細胞内蓄積について、GLUT1 阻害剤 phloretin の非存在下から存在下の差分を GLUT1 介在性輸送活性として評価した。その結果、pioglitazone およびロシグリタゾンのいずれの処理によっても濃度依存的に GLUT1 輸送

活性が上昇することが認められた。

次に、HIF-1 の標的遺伝子である BCRP mRNA の発現について調べたところ、pioglitazone 処理による BCRP mRNA の発現誘導が認められた。

続いて、BCRP の機能面での変動について評価するため、BCRP 介在性輸送活性に及ぼす pioglitazone 処理の影響について検討した。ここでは、各種濃度の PPAR アゴニスト処理を行った細胞における Hoechst33342 の細胞内蓄積について、BCRP 阻害剤 Ko143 の存在下から非存在下を差し引き、BCRP 介在性輸送の変動を評価した。その結果、pioglitazone 処理濃度依存的に BCRP 輸送活性が上昇することが認められた。

これらの結果より、脂肪酸結合型アルブミン曝露による HIF-1 活性化には、少なくとも一部、PPAR を介した経路が関与する可能性が示唆された。

以上の結果は、タンパク尿を呈する CKD 患者の腎近位尿細管上皮細胞における薬物トランスポーターを含む各種タンパク質の発現や機能変動を考える上で、重要な基礎的知見になるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者および連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Nishihashi K, Kawashima K, Nomura T, Urakami-Takebayashi Y, Miyazaki M, Takano M, Nagai J. Cobalt Chloride Induces Expression and Function of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) in Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cell Line HK-2. *Biol Pharm Bull.* 40(1):82-87 (2017), 査読有
doi: 10.1248/bpb.b16-00684

Nagai J, Yamamoto A, Katagiri Y, Yumoto R, Takano M. Fatty acid-bearing albumin but not fatty acid-depleted albumin induces HIF-1 activation in human renal proximal tubular epithelial cell line HK-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 450: 476-481 (2014), 査読有
doi: 10.1016/j.bbrc.2014.05.146

[学会発表](計12件)

竹原一揮、仲川直輝、竹林裕美子、宮崎誠、永井純也、腎近位尿細管上皮細胞へのアルブミン負荷に伴う HIF-1 活性化を導く脂肪酸の同定：GULT 輸送活性を指標とした解析、日本薬学会第 137 年会、平成 29 年 3 月 25 ~ 27 日、仙台市

村田 匡、黒田幸美、柴田 葵、竹林裕美子、宮崎 誠、永井純也、腎近位尿細管上皮細胞における HIF-1 標的遺伝子産物 GLUT1

および BCRP の発現・機能に及ぼす PPAR アゴニストの影響、平成 29 年 3 月 25 ~ 27 日、仙台市

黒田幸美、竹林裕美子、宮崎 誠、永井純也、腎近位尿細管上皮細胞におけるアルブミン誘発 HIF-1 活性化の分子機構解析 PPAR 作動薬 pioglitazone による HIF-1 誘導について、第 66 回 日本薬学会近畿支部総会・大会、平成 28 年 10 月 15 日、高槻市

大久保佐和子、竹林裕美子、宮崎 誠、永井純也、腎近位尿細管上皮細胞におけるアルブミン結合脂肪酸の細胞内移行特性、平成 28 年 10 月 15 日、高槻市

西橋佳津希、川嶋 圭、宮崎 誠、岩永一範、永井純也、HIF-1 活性化による ABC トランスポーター発現と抗がん剤による細胞障害性の変動解析、日本薬剤学会第 31 年会、平成 28 年 5 月 19 ~ 21 日、岐阜市

Junya Nagai, Fatty acid-bearing Albumin Enhances the Expression and Function of BCRP Transporter via HIF-1 Activation in Renal Proximal Tubular Epithelial Cells, BIT 's 9th Annual World Protein & Peptide Conference 2016, April, 25-28, International Conference Center, Dalian, China

川嶋 圭、野村 嶺、西橋佳津希、宮崎誠、岩永一範、永井純也、腎近位尿細管上皮細胞における HIF-1 活性化に伴う BCRP 機能亢進と薬剤性細胞障害に及ぼす影響、日本薬学会第 136 年会、平成 28 年 3 月 27 ~ 29 日、横浜市

永井純也、野村 嶺、田中千尋、岩永一範、宮崎 誠、高野幹久、腎近位尿細管上皮細胞における BCRP および P-糖タンパク質活性に及ぼす脂肪酸結合アルブミンの影響、日本薬物動態学会第 30 回年会、平成 27 年 11 月 12 ~ 14 日、東京都江戸川区

野村 嶺、田中千尋、宮崎 誠、岩永一範、永井純也、ヒト腎近位尿細管上皮細胞株におけるアルブミン誘発 BCRP 輸送活性の上昇：脂肪酸の関与、第 65 回日本薬学会近畿支部総会・大会、平成 27 年 10 月 17 日、大阪大谷大学、富田林市

松村里子、坂上 弘恵、宮崎 誠、岩永一範、永井純也、アルブミン共存下における BODIPY® FL C16 の尿細管上皮細胞内移行特性、日本薬剤学会第 30 年会、平成 27 年 5 月 21 ~ 23 日、長崎市

坂上弘恵、松村里子、宮崎 誠、岩永一範、永井純也、ヒト肝由来 HepG2 細胞にお

ける BODIPY® FL C16 の細胞内取り込みに
及ぼすアルブミン共存の影響、平成 27 年 5
月 21 ~ 23 日、長崎市

Junya Nagai and Mikihisa Takano,
Activation of HIF-1 by albumin overload in
renal proximal tubular epithelial cell,
International Symposium on Epithelial
Barrier and Transport 2014, Nov. 1 ~ 2,
2014, Kusatsu, Shiga

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.oups.ac.jp/kenkyu/kenkyuushi
tu/yakuzai.html](http://www.oups.ac.jp/kenkyu/kenkyuushi
tu/yakuzai.html)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

永井 純也 (NAGAI, Junya)
大阪薬科大学・薬学部・教授
研究者番号 : 20301301